プリオンの分子生物学

舩甚賢太郎・横山 隆

(独) 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所

Molecular biology of Prion

Kentaro MASUJIN, Takashi YOKOYAMA

National Institute of Animal Health

1. はじめに

プリオン病は、ヒトおよび動物における致死性の中枢神経変性疾患である。動物のプリオン病として、ヒツジおよびヤギのスクレイピー、ウシの牛海綿状脳症 (bovine spongiform encephalopathy; BSE)、シカの鹿慢性消耗病 (chronic wasting disease; CWD)、ミンクの伝達性ミンク脳症 (transmissible mink encephalopathy; TMS)、ネコの手綿状脳症 (feline spongiform encephalopathy; FSE) 等が知られており、動物のプリオン病は全て感染によって起こると考えられている。一方、ヒトのプ

リオン病は、遺伝病の側面をもち、その発病機序によって、いくつかに分類されている (表 1)。

プリオン病の病原体として、プリオン (proteinaceous infectious particles; 感染性を持つタンパク質粒子) が提唱されている。病原体とされるプリオンの本態は未だ明らかとされていないが、現在、プリオンの主要構成成分として、異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) が考えられている。プリオン病の主徴として、脳におけるアストログリア (星状膠細胞) の増加と神経細胞の脱落による空胞変性 (海綿状脳症) および PrP^{Sc} の蓄積が認めら

表 1. 動物およびヒトのプリオン病

ヒツジ・ヤギ	スクレイピー (Scrapie)
ウシ	牛海綿状脳症 (bovine spongiform encephalopathy; BSE)
シカ	鹿慢性消耗病 (chronic wasting disease; CWD)
ミンク	伝達性ミンク脳症 (transmissible mink encephalopathy; TMS)
ネコ	ネコ手綿状脳症 (feline spongiform encephalopathy; FSE)
ヒト	PrP 遺伝子変異なし・原因不明 (散発的発生)
	・ 弧発性クロイツフェルト・ヤコブ病 (sporadic Creutzfeldt-Jakob disease; sCJD)
	PrP 遺伝子変異あり
	・ 家族性 CJD (familial CJD; fCJD)
	・ ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群 (Germann-Sträussler-Scheinker syndrome; GSS)
PrP 遺伝子変異なし	・ 致死性家族性不眠症 (fatal familial insomnia; FFI)
	医原性 (硬膜移植・ヒト成長ホルモンなど)
	・ 医原性 CJD (iatrogenic CJD; iCJD)
	・ クールー (Kuru)
	・ 変異型 CJD (variant CJD; vCJD)

連絡先: 舩甚賢太郎、(独) 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所・プリオン病研究センター 〒305-0856 茨城県つくば市観音台 3-1-5 (e-mail: masujin@affrc.go.jp)

れる。

プリオン病の病原体は、ウィルスや細菌ではなく、感染性を持つタンパク質の粒子であること。また、プリオン病には遺伝病の側面があることなど、従来の感染症の範疇を越えた特異な疾患といえる。

本稿では、これらの疾患を引き起こすプリオンについて概説すると共に、プリオンの分子生物学的な知見およびウシのプリオン病である BSE とその発病機序の解明に向けた我々の研究について紹介する。

2. プリオン病とプリオン

最も古くから知られているプリオン病は、ヒツジのスクレイピーである。北欧を中心に 200 年以上前から発生が認められ、ヒツジの経済的被害の主な原因となっていた。スクレイピー (scrapie) の名称は、スクレイピーを発症した多くのヒツジが牧場などに身体を擦りつけ脱毛症状を示すことから、この特徴的な症状である擦りつける (scrape) に由来する。スクレイピーは、当初遺伝性の疾患だと考えられていた。その後、Cuile と Chelle (1936) により、ヒツジを用いて伝達性が確認されたことから、スクレイピーは遺伝病でなく、伝達性の疾病であることが示された。Hadlow (1959) は、パプアニューギニアのフォア族の間で流行していた致死性の進行性中枢神経疾患クールーとスクレイピーが病変の類似性から同じ病因に起因する可能性を指摘した。その後、Gajdusek ら (1967) および Gibbs ら (1968) のチンパンジーを用いた伝達試験より、クールーと CJD の伝達性が立証されたことで、スクレイピー、クールーおよび CJD は同様の病原体による伝達性の疾病であることが示唆された。しかし、その病原体が明らかにされることはなかった。

病原体の解明に大きく貢献したのが、実験動物へのプリオンの伝達である。Chandler (1961)、Zlotnik と Renni (1962) はスクレイピーに感染したヒツジの脳をマウスに脳内接種し、スクレイピーがマウスに伝達可能で海綿状脳症を再現できることを示した。ヒツジを用いた伝達試験の実施は、発症までの潜伏期間が 3～4 年を要し、ヒツジを長期間飼育するための施設および経済的な問題が残っていた。一方、マウスを用いることで、多数の個体を比較的経済的に扱え、潜伏期間も短く (120～150 日)、経済面・施設面だけでなく時間の短縮も可能とした。このことは、同時に実験動物が飼育出来ればプリオン病研究を実施可能であることを意味し、研究機関の幅を広げ、さらに研究者の数と研究層を増やすことになった。そして、1980 年 Prusiner

らは、スクレイピーに感染したハムスター脳から生化学的処理と超遠沈法を組み合わせることにより感染性が高い画分の抽出に成功した (Prusiner ら 1980)。この精製画分は、1) 蛋白質変性剤および蛋白質分解酵素で処理すると、その感染性は極端に低下または消失する。2) 紫外線や電離放射線、および核酸分解酵素などの核酸を分解する処理では感染性に変化は認められない。3) この画分構成成分を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法で解析すると、分子量が 27～30 kDa (PrP27-30) のバンドが検出され、バンドは感染ハムスター脳からのみ検出される (Bolton ら 1982)。これらの成績から、Prusiner (1982) は、蛋白質から構成される感染因子 (proteinaceous infectious particles: プリオン) がスクレイピーの病原体であるというプリオン説を提唱した。その後の研究から、プリオンはスクレイピー感染ハムスターのみならず、CJD、クールーなどにも同様に発見され、プリオンとプリオン病との関連性が立証された。

3. プリオン蛋白質の発見

プリオン病の病原体が蛋白質であると考えられたことから、プリオンをコードする遺伝子の探索が行われた。Oesch ら (1985) は、スクレイピー感染ハムスター脳由来プリオンについて、プリオンを構成する主要なアミノ酸配列の一部を解読し、感染動物の脳からプリオンをコードする相補的 DNA (cDNA) の単離を試みた。その結果、スクレイピー感染動物の脳より cDNA の単離に成功し、この遺伝子をプリオン蛋白質遺伝子 (遺伝子表記として、*PRNP*、マウスでは *Prnp* であるが、本稿では PrP 遺伝子として統一する)、発現する蛋白質をプリオン蛋白質 (PrP) と呼んだ。しかし、非感染動物の脳にも PrP 遺伝子が存在することが示された。このことから、プリオンは外来性遺伝子によりコードされるのではなく宿主の持つ遺伝子 (PrP 遺伝子) によりコードされ、合成される蛋白質であることが明らかになった。そこで、非感染 (正常) 個体に存在する蛋白質とスクレイピー感染個体に存在する蛋白質を区別するために、同遺伝子の正常産物を PrP^C (cellular isoform of prion protein: 正常プリオン蛋白質) とし、感染個体に存在する蛋白質は PrP^{Sc} (Scrapie isoform of prion protein: 異常プリオン蛋白質) と命名された。

4. プリオン蛋白質遺伝子とプリオン蛋白質

PrP をコードする PrP 遺伝子が宿主の染色体上に同定されて以来、PrP 遺伝子とその産物である PrP につ

いて、そして、それらのプリオン病との関連性について解析が進められた。現在、PrP はプリオンの増殖・複製、および発病機序に非常に重要な因子であると考えられている。

4-1. PrP 遺伝子の構造

PrP 遺伝子は、ヒトの第 20 染色体 (Sparkes ら 1986)、マウスでは第 2 染色体 (Westaway ら 1994)、ウシにおいて第 13 染色体 (Schlapfer ら 1998) 上に存在する。マウス、ウシの PrP 遺伝子は 3 つのエクソンから構成され、ウシでは約 4.3 kb、マウスでは約 2.5 kb の mRNA が転写される。第 1,2 エクソンは 5' 非翻訳領域として蛋白質を翻訳することはなく、蛋白質翻訳領域 (ORF)

は、第 3 エクソンのみに存在する。一方、ヒト、ハムスターの PrP 遺伝子は 2 つのエクソンから構成されている。ヒト、ハムスターともに約 2.5 kb の mRNA が転写され、ORF は第 2 エクソンに存在する (Puckett ら 1991; Horiuchi ら 1998; Lee ら 1998) (図 1)。

PrP 遺伝子は、神経系組織、リンパ系組織、骨格筋、心筋、副腎、消化管、子宮、膵臓、脾臓、心臓、肺、腎臓、精巣などあらゆる組織で発現が認められ、特に神経系組織で高い発現が認められている (Bendheim ら 1992; Horiuchi 1995)。

4-2. 正常プリオン蛋白質 (PrP^C)

PrP^C の構造を図に示す (図 2)。PrP^C は動物種により

図 1. PrP 遺伝子の構造

図 2. ハムスターの PrP^C・PrP^{Sc} および PrP27-30

表2. ホ乳類動物間での PrP におけるアミノ酸配列の相同性 (%)

	ヒト	マウス	ハムスター	ヒツジ	ウシ
ヒト	—	89	87	90	88
マウス	—	—	93	87	84
ハムスター	—	—	—	88	86
ヒツジ	—	—	—	—	94
ウシ	—	—	—	—	—

多少の違いが存在するが、約 250 アミノ残基から成るポリペプチド鎖として合成される。プリオン蛋白質のアミノ酸配列はホ乳類動物間で非常に良く保存され、84 %以上の高い相同性を持つ(表2)。PrP^Cは、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカー型膜タンパク質であり、GPIアンカー型蛋白質に特徴的なN末端のシグナル配列(SP)とC末端のGPIアンカー付加シグナル配列(HB)を有する(図2)。N末端シグナル配列は、ポリペプチド鎖を小胞体内へ輸送するために必要とされ、輸送後切断される。同様に、GPIアンカー付加シグナル配列も切断されるが、その切断部位に糖脂質であるGPIアンカーが結合する。これらの修飾を受け成熟したPrP^Cは、GPIアンカーを介して細胞膜外側に局在することになる(Baslerら1986; Stahlら1990)。PrP^CのC末端側には2カ所のシステイン残基と2カ所のアスパギン残基が存在し、それぞれが分子間ジスルフィド結合(S-S結合)と糖鎖付加に関与する。これらのS-S結合および糖鎖付加部位もアミノ酸配列同様にホ乳類動物間で保存されている。また、N末端にはオクタリピートと呼ばれるグリシンに富む8アミノ酸の繰返し配列(PHGGGWGQ)が存在し、繰返し数に異なりはあるが、すべてのホ乳類動物で同様の繰返し配列が認められる。この繰返し配列に存在するヒスチジン残基は銅イオンと結合することが知られているが、その機能については未だ明らかとされていない(Hornshawら1995)。

PrP^CはPrP遺伝子のプロモーター領域構造から、生命維持に必須な重要な機能を持つと推測されたが、PrP遺伝子欠損マウスは表現型に異常はなく、正常に発育・繁殖可能であったことから、PrP^Cは生命維持に重要な蛋白質ではないと考えられている(Buelerら1992)。その後の解析から、PrP^Cはリンパ球の活性化(Cashmanら1990)、シナプス伝達(Collingeら1994)、神経細胞のシグナル伝達(Mouillet-Richardら2000)、概日周期

表3. PrP^CとPrP^{Sc}の性状

	PrP ^C	PrP ^{Sc}
分子量	33–37 kDa	33–37 kDa
二次構造		
α ヘリックス	43 %	30 %
β シート	3 %	45 %
凝集性	なし	あり
細胞局在	細胞表面	細胞質(二次リソソーム)
合成時間	< 30 分	6–15 時間
半減期	～5 時間	> 24 時間
蛋白質分解酵素(PK)	感受性	抵抗性
界面活性剤	易溶性	難溶性
熱および化学薬品	感受性	抵抗性
感染性	なし	あり

(Toblerら1996)、抗酸化機構(Klamtら2001)、銅代謝(Brownら1997)、神経細胞死(Sakaguchiら1996)、細胞内の恒常性の維持(Hermsら2001)などに関与するという報告がなされているが、詳細な機能は分かっていない。

4-3. 異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})

PrP^CとPrP^{Sc}の間にはアミノ酸の一次構造に違いは認められないが(図2)、タンパク質分解酵素(プロテナーゼK; PK)に対する部分抵抗性、凝集性、界面活性剤への不溶性および感染性の有無により両者は区別されている(表3)。これらの生化学的・生物学的性状の違いは、PrP^Cの β シート型構造が3 %以下であるのに対して、PrP^{Sc}では40 %以上となる蛋白質の高次構造の変化がその要因であると考えられている(Panら1993)。

PrP^{Sc}は、感染性と相関していることからプリオン

の主要構成成分と考えられているが、PrP^Cの構造異数体である PrP^{Sc}がどのようなメカニズムで中枢神経系疾患を引き起こすかは明らかにされていない。また、PrP^{Sc}は発症個体のみ検出されることから、プリオン病の唯一の疾病特異的なマーカーとされている (Bolton ら 1982; Prusiner ら 1991)。

4-4. プリオン複製機構

プリオンが体内で複製するメカニズムは未だ明確にはなっていない。PrP 遺伝子欠損マウスにプリオンを接種しても発症しないことから、宿主内で合成される PrP^Cがプリオンの複製に必須であると考えられている。

現在、プリオンの複製機構について2つの説が存在する。1つは、Prusiner ら (1991) が提唱するヘテロダイマー説、もう一方は Jarrett と Lansbury (1993) が提唱する核依存重合説である (図3)。ヘテロダイマー説は、1分子の PrP^C と 1分子の PrP^{Sc} が会合し、PrP^C が PrP^{Sc} に構造変換する。構造変換に伴い2分子になった PrP^{Sc} は解離し、新たに PrP^C と会合し、複製・増殖が繰り返されるというものである。核依存重合説は、重合した PrP^{Sc} を鋳型として、この重合体に PrP^C が会合することで、PrP^{Sc} に構造変換するというものである。両説は異なる複製機構に思われるが、いずれも PrP^{Sc}

が鋳型となり PrP^C の高次構造変化させることで PrP^{Sc} を複製・増殖させるという考えに基づいている。この反応が繰り返し起こることで複製・増殖した PrP^{Sc} は神経細胞内外で凝集・蓄積し、神経細胞の機能不全や神経細胞死が起こり、宿主は死に至ると考えられている。

PrP^{Sc} がプリオンの主要構成成分であることは、広く理解されるようになってきている。しかし、PrP^{Sc} の立体構造、PrP^C から PrP^{Sc} への変換と複製機構、PrP^{Sc} が神経変性疾患を誘起するメカニズムなど、多くの未解明な問題が残されている。

5. PrP のアミノ酸多型とプリオン感受性

宿主の PrP のアミノ酸多型によって、プリオンに対する感受性に有意な差が生じることが明らかになっている。

5-1. 潜伏期間と PrP のアミノ酸多型

Dickinson ら (1968) および Carlson ら (1986) のグループは、異なる系統のマウスを用いたスクレイピー感染実験において、同一の接種材料を接種しているにも関わらず、系統間で発症までの潜伏期間に短い系統と長い系統が存在することを発見した。彼らは、この結果を受けてスクレイピーの潜伏期間を支配する宿主遺

図3. PrP^CからPrP^{Sc}への変換・増殖メカニズム

伝子の存在を示唆した。その後、PrP 遺伝子が同定され、両系統マウスの PrP 遺伝子の塩基配列が決定されると、両マウスの PrP 内のコドンに2カ所の相違があることが明らかになった。潜伏期間の短い系統では108番目のコドンがロイシン(L)、189番目のコドンがチロシン(Y)であるのに対し、長い系統の108番目のコドンはフェニルアラニン(F)、189番目のコドンはバリン(V)であった(Westaway ら 1987)。PrP のアミノ酸多型と潜伏期の関与を明らかにするため、潜伏期間の異なる系統間で PrP 遺伝子を置換したマウスを作成し、感染実験を行った結果、PrP のアミノ酸多型と潜伏期間の間に関連性が証明され(Moore ら 1998)、潜伏期間を支配する宿主遺伝子は PrP 遺伝子であることが明らかとされた。

5-2. ヒツジの PrP アミノ酸多型とスクレイピー感受性
マウス同様にヒツジにおいても PrP のアミノ酸多型とプリオン感受性との関連性が示され、ヒツジの PrP には20以上のアミノ酸多型が存在することが知られている。これまでのスクレイピー感染実験および野外発生の疫学的な調査から、特にコドン136(バリン; V/アラニン; A)、コドン154(アルギニン; R/ヒスチジン; H)、およびコドン171(グルタミン; Q/アルギニン; R)のアミノ酸が感受性と抵抗性に関与することが明らかとなっている(Goldman ら 1994)(表4)。コドン136-A、コドン154-R、コドン171-Qのアミノ酸多型を有するヒツジ(PrP^{ARQ})は、もっとも出現頻度が高いことから野生型と呼ばれている。コドン136-Vのアミノ酸多型を持つヒツジ(PrP^{VRQ})はスクレイピー高感受性、コドン171-Rのアミノ酸多型を持つヒツジ(PrP^{ARR})は、

ただ1例の例外を除き(Ikeda ら 1995)、スクレイピー高抵抗性であると考えられている。また、アミノ酸多型AHQを持つヒツジ(PrP^{AHQ})もスクレイピー感染個体発生率が少ないことから、スクレイピー抵抗性と考えられている(Luhlken ら 2004)。

スクレイピー高抵抗性を示す PrP^{ARR/ARR} ヒツジは、BSE に対しても抵抗性を示すと考えられたが、BSE 感染実験により BSE に感染することが示されている(Houston ら 2003)。

ウシにおいても、同様のプリオン感受性に関連性のあるアミノ酸多型について調べられているが、ウシではBSEの感受性に影響するアミノ酸多型は見つっていない。ヒトでは、コドン129(メチオニン; M/バリン; V)とコドン219(グルタミン酸; E/リジン; K)のアミノ酸多型が、感受性および抵抗性に関与することが知られている。

5-3. 非定型スクレイピー

ARR および AHQ allele (対立遺伝子)をホモ接合またはヘテロ接合で持つヒツジは、スクレイピーに抵抗性を示すことから、ヨーロッパのいくつかの国では、この多型を指標にスクレイピー抵抗性ヒツジの選択的育種が行われている。しかし、近年、ノルウェー(Benestad ら 2003)、フランス(Le Dur ら 2005)、ドイツ(Buschmann ら 2004)、ベルギー(Be Bosschere ら 2004)において、これまで抵抗性と考えられたアミノ酸多型を持つヒツジにもスクレイピーが確認され、感染個体から分離された PrP^{Sc} の生物学的性状が、これまで知られていたスクレイピーの PrP^{Sc} とは異なることから、非定型スクレイピーと呼ばれている。その被

表4. ヒツジの PrP におけるアミノ酸多型

コドン	アミノ酸多型		スクレイピー感受性への関与
112	Met / Thr	M / T	
136	Ala / Val	A / V	V: 高感受性
137	Met / Thr	M / T	
138	Ser / Asn	S / N	
141	Leu / Phe	L / F	
151	Arg / Cys	R / C	
154	Arg / His	R / H	H: 抵抗性
171	Cln / Arg / His	Q / R / H	Q: 感受性 , R: 高抵抗性
211	Arg / Gln	R / H	

害は確実に広がりつつある。現在、我が国では非定型スクレイピーは確認されていないが、EU 諸国では防止対策を強化するとともに、スクレイピー制圧のために行われてきた遺伝的な選択的育種を今一度見直す必要に迫られている。

6. プリオン病の診断

ヒトのプリオン病の診断は、神経細胞の傷害マーカーとして知られる髄液蛋白質 14-3-3 タンパク質の検出、脳波測定における周期性同期性放電の有無および磁気共鳴映像法 (MRI) 所見などの臨床検査法と PrP 遺伝子診断による変異の有無を調べることで行われる。一方、ヒト以外の動物種においては、ヒト同様の生前診断は確立されておらず、検査は死亡または病理解剖後に行われる。診断は唯一の疾病特異的なマーカーである PrP^{Sc} の検出により行われ、検査部位にはもっとも PrP^{Sc} の蓄積が認められる脳が使用される。プリオン病の診断に用いられている方法を以下に示す。

6-1. 固相酵素免疫測定 (ELISA)

PrP^{Sc} と PrP^C は一次構造が同じため、現在、診断に応用可能な抗 PrP 抗体は両者を識別することはできない。そのため、PrP^{Sc} と PrP^C の PK 処理に対する抵抗性の違いを利用して、両者を識別する。

PK 処理により PrP^C を消化した試料を 96 穴プレート等の固相に直接吸着させるか、または抗体を用いて選

択的に PrP^{Sc} を捕捉させた後、抗 PrP 抗体を反応させ、酵素発色により検出する。ELISA には、多数の検体について迅速、簡便に検査ができるというメリットがあるが、非特異的な反応による偽陽性シグナルと特異的な陽性シグナルを識別することができないというデメリットがある。

6-2. ウェスタンブロッティング法 (WB)

試料を PK で消化した後、SDS-PAGE により蛋白質を分離し、各蛋白質を膜に転写後、抗 PrP 抗体と反応させる。正常個体の脳乳剤では PK 処理により PrP^C は分解され、抗 PrP 抗体と反応する蛋白質は検出されない。一方、感染個体の脳乳剤では 33–37 kD の完全長の PrP^{Sc} から部分分解された 27–30 kD の PrP^{Sc} 断片 (図 2) が残存し、抗体との反応によりバンドが検出される。PrP には 2 カ所の糖鎖付加部位があるため、無糖鎖、1 糖鎖、2 糖鎖の 3 本の PrP バンドが検出される (図 4)。WB では、PrP^{Sc} の分子量やバンドパターンにより非特異的な反応との識別も可能である。

6-3. 免疫組織化学的検査 (IHC)

脳組織をホルマリン固定し、脱水、パラフィン包埋後、薄切することで組織切片を作成する。ギ酸およびオートクレーブ処理により PrP^{Sc} の抗原賦活化を行った後、抗 PrP 抗体と反応させ、酵素発色により検出する (図 5A)。IHC は、組織上での PrP^{Sc} の蓄積の有無や

図 4. WB による PrP^{Sc} の検出

図5. BSE 感染牛における免疫組織化学的検査および病理学的検査
A: 免疫組織化学的検査 (IHC) 延髄門部迷走神経背側核。PrP^{Sc} の蓄積が顕著に認められる。
B: 病理組織学的検査 (HE 染色) 延髄門部孤束核。神経網に卵円形ないし円形の空胞が観察される。

蓄積部位を調べることを可能とする。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による神経網や神経細胞内に形成される空胞等の病理組織学的所見と関連づけて診断は行われている (図5B)。

6-4. 実験動物を用いたプリオン伝達試験

動物接種試験は乳剤化した試料をマウスの脳内に接種し、発症の有無を指標として試料中にプリオンが含まれているか否かを調べる方法である。他の方法が PrP^{Sc} の検出を指標としているのに対して、唯一感染性の有無を調べる方法である。しかし、「種の壁」の問題に加え、微量の PrP^{Sc} しか含まない試料の場合、発症までに2年以上の期間を要する場合があるなど、判定までに期間が必要であるデメリットがある。「種の壁」の機序は明らかとされていないが、PrP^{Sc} の立体構造および PrP^{Sc} と PrP^C のアミノ酸配列の相同性に規定されると考えられている。現在、「種の壁」の問題を回避するため、内在性のマウス PrP 遺伝子を欠損させ、ヒト、ウシなどの PrP 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが作出されており、高感度な感染性の検定が可能になっているが、判定が得られるまでの時間的な制約は解消されておらず、その用途は限られている。

BSE 検査では、個体より採取した脳について ELISA 法を用いて1次スクリーニングを行い、BSE 陽性と疑われた個体は、ウェスタンブロット法、免疫組織化学

的検査および病理学的所見により確定診断される。

7. 牛海綿状脳症(BSE)

1986年に英国で初めて報告された牛海綿状脳症 (BSE) (Wells ら 1987) は、現在、日本を含めて25カ国に拡大し、これまで18万頭を越える牛で発生が確認されている。BSE 感染牛は音や接触に対する過敏反応、異常姿勢を示し、発症末期には起立不能等の臨床症状を示す。潜伏期間は、野外例では2～8年、平均5年と考えられている。

BSE の発生起源は未だ明らかとなっていないが、スクレイピー感染ヒツジの肉屑から作られた動物性タンパク質飼料が原因と考えられている。その後の BSE の世界的蔓延は、BSE 感染牛から作られた汚染肉骨粉がウシの飼料として与えられたことに起因すると考えられている。したがって、BSE は食用動物の屑肉リサイクルと人為的な家畜肥育という近代畜産が引き起こした感染症と考えられる。

BSE 感染牛の多くは英国で発生しており、英国では1992年の約3万7,000頭をピークに発生数は減少し、2005年には225頭まで減少し、2006年6月現在では、61頭と激減している。これは、英国政府が1987年7月にウシ、ヒツジなど反芻動物への肉骨粉の給餌を禁止したことが効果的であったことを示している。このことから、BSE の蔓延の原因は肉骨粉の経口摂取である可能性を強く示唆している。

英国より肉骨粉を輸入していた我が国では、2001 年 9 月に千葉県で BSE の初発が確認されて以来、2006 年 9 月までに、計 29 例の BSE 感染牛が確認されている。

8. BSE と vCJD との関連性

ヒツジのプリオン病であるスクレイピーにおいて、ヒトへの感染例がないことから、BSE は畜産業への甚大な被害は免れないが、単なるウシの奇病として認識されていた。

1996 年、英国において、臨床像、病理所見が従来知られていた sCJD とは著しく異なる vCJD 患者が見出された (Will ら 1996)。vCJD 患者のその多くが BSE 発生源である英国をはじめ、EU 諸国で在住または滞在歴がある等の疫学的知見から、vCJD は BSE 感染牛に由来する食品を摂取したことによるウシからヒトへの BSE の伝播により発生した可能性が報告された。これを受けて、全世界に BSE パニックが襲った。その後、vCJD 患者から分離された PrP^{Sc} は、1) 生化学的性状 (糖鎖パターン) (Collinge ら 1996)、2) 野生型マウスおよびヒト型またはウシ型プリオン蛋白質遺伝子トランスジェニックマウスを用いた接種試験における潜伏期間、臨床症状および脳内病変分布 (Bruce ら 1997; Hill ら 1997; Scott ら 1999)、3) サルへの接種試験における臨床症状および病変分布 (Lasmézas ら 2001) 等で、BSE の PrP^{Sc} と類似することが報告された。これらの結果から、vCJD と BSE は同一のプリオンに起因すると結論されている。

現在、英国をはじめ世界の vCJD 患者は延べ 196 人 (2006 年 9 月時点) 確認されており、世界全体における vCJD 患者のほとんどが英国 (162 人) に集中している。日本における vCJD 患者は 1 名報告されているが、英国滞在時に感染した可能性が考えられている。英国での vCJD 患者は、2000 年の 28 人をピークに減少傾向にあるが、この減少傾向に反して、プリオン病のその潜伏期間の長さから、未発症の感染患者の存在が危惧されている。英国において、虫垂あるいは扁桃除去手術後の組織試料について免疫組織化学的に PrP^{Sc} の蓄積を調べた結果、約 1 万に 3 人の割合で PrP^{Sc} 陽性であった。そこから推察される現在の英国内の感染者は 3,500 名程度という報告も存在する (Hilton ら 2004)。近年、vCJD の発生にともない、最も問題となっているのが、vCJD 患者から医療行為を介して健常者が感染する二次感染 (医原性 CJD) の発生である。プリオンの不活性化は非常に困難であるため、医療現場では医原性を防ぐために多くの労力が費やされている。潜在

的な vCJD 患者の存在が示唆され、vCJD 患者からの輸血を介した vCJD 患者 (ヒトからヒトへ感染例) も報告されていることから (Llewelyn ら 2004)、今後さらに、医療業務に多大な影響を及ぼすと考えられている。

9. BSE プリオンの分布

BSE 発生以降、BSE 感染牛体内の BSE プリオンの分布および発病機序を明らかにするため、野生型マウスおよびウシを用いた感染試験により、BSE 感染牛のさまざまな組織について感染性の評価がされている。

9-1. BSE 自然感染牛における BSE プリオン分布

BSE 自然発症牛の組織について、野生型マウスを用いた感染試験が行われ、脳、脊髄、および眼の 3 つの組織において感染性が確認された。このことから、BSE プリオンは、主に中枢神経系組織に局限すると考えられた (Fraser と Foster 1993)。

9-2. ウシを用いた BSE 経口感染実験

英国において、大規模な BSE 経口感染実験が行われ、経口より接種された BSE プリオンの経時的な体内分布が明らかにされている。経口感染実験の概要として、4 ヶ月齢の子ウシに 100 g の BSE 感染牛の脳乳剤を経口接種した後、2～4 ヶ月間隔で 2～5 頭ずつ屠殺し、組織を採取する。次に、経口感染牛より採取した組織について、野生型マウスを用いた感染試験を行うことで、接種後月数における各組織の感染性の有無を調べるものである。

野生型マウスでの感染試験の結果、経口接種後 6 ヶ月目の牛の回腸遠位部に初めて感染性が認められ (Wells ら 1994)、その後、接種後 32 ヶ月目以降の脳、脊髄、そして末梢神経節である背根神経節、および三叉神経節で感染性が認められた (Wells ら 1996; 1998)。また、接種後 36 ヶ月目のウシ 1 例の骨髄から極めて低い感染性が検出されている (Wells ら 1999)。BSE を経口接種された子ウシは接種後 35 ヶ月以降に発症が確認されたことから、BSE プリオンは潜伏期間末期に中枢神経系組織に分布することが明らかにされた。

9-3. BSE 経口感染牛組織におけるウシを用いた感染試験

プリオンの感受性には、「種の壁」が大きく影響する。そこで、マウスを用いた感染性評価の成績から、特に重要であると判断された BSE 経口感染牛の組織について、ウシを用いた感染試験 (BSE プリオンに対

する感度は野生型マウスの500倍)が行われた。その結果、経口接種32ヶ月後の脊髄および脳、6～18ヶ月目の回腸遠位部で感染性が認められ、接種後10ヶ月目に採取した扁桃について1例だが感染性が検出された。一方、筋肉を含めた、その他の組織において、感染性は認められず、経口接種後22ヶ月および26ヶ月経過したウシのいずれの組織からも感染性は認めなかった。

これらの結果から(表5)、プリオンは飼料とともに経口から摂取された後、消化管の回腸遠位部から体内に取り込まれ、末梢神経を通して、中枢神経系組織に到達すると推測され、中枢神経組織での感染性は発症

直前に初めて検出されることから、この時期にプリオンは中枢神経系組織で増殖・蓄積され、致死性の中枢神経系の疾患を引き起こすと考えられた。しかしながら、消化管から中枢神経系組織までの経路の解明には至っていない。中枢神経系組織に到達するまでのプリオンの動態を明らかにすることが、食の安全を考える上で重要な課題となっている。

10. 特定危険部位 (SRM)

これまでのマウスおよびウシでの感染試験から、BSEプリオンが含まれている危険性がある組織を特定危険部位 (SRM) として定め、ヒトの食用から排除さ

表 5. 自然感染牛および BSE 経口実験感染牛における BSE プリオンの体内分布

臨床症状 接種後月数(ヶ月)	自然感染	経口実験感染				
	発症	発症(35ヶ月)				
	－	6	10	14～18	32	36
脳	＋				＋	＋
脊髄	＋				＋	＋
網膜						
背根神経節					＋	＋
三叉神経節						＋
回腸遠位部		＋	＋	＋		＋
骨髄 ¹⁾						＋
扁桃 ²⁾			＋			

感染性の検出は野生型マウスおよびウシを用いた感染性試験によって行われた。
＋; 感染性あり, ¹⁾マウスを用いた感染性試験でのみ陽性, ²⁾ウシを用いた感染性試験でのみ陽性

表 6. 各国で定められている牛の特定危険部位 (SRM)

日本		欧州 (EU)		アメリカ	
全月齢	頭部(舌、頬肉を除く)、脊髄、回腸遠位部(小腸の末端部、盲腸との接続部位から2mまでの部位)、脊柱(背根神経節)	全月齢	扁桃、小腸(十二指腸から直腸)、腸間膜	全月齢	扁桃、小腸(十二指腸から直腸)
		12ヶ月齢以上	頭蓋骨、脳、眼、脊髄	30ヶ月齢以上	頭蓋骨、脳、三叉神経節、眼、脊髄、脊柱(尾椎、胸椎、腰椎横突起、仙椎翼を除く)背根神経節
		24ヶ月齢以上	脊柱(尾椎、胸椎、腰椎横突起、仙椎翼を除く)、背根神経節	備考	日本に輸出される牛肉等には上乗せ規制あり

れている。しかし、SRM の定義は国によって異なっている (表 6)。我が国では、2001 年 9 月の BSE 初発例を受けて、BSE の伝播防止と食肉の安全対策として 2001 年 10 月から SRM の除去が施行されている。現在、我が国の SRM の定義は、全月例を対象とし、頭部 (舌、頬肉を除く)、脊髄および脊柱 (背根神経節を含む)、回腸遠位部 (小腸の末端部分、盲腸との接続部位から 2 m までの部位) が指定されている。これらの組織は BSE 検査の結果を問わず、廃棄処分され、ヒトへの食用が禁止されている。

11. 末梢神経における PrP^{Sc}

近年、我が国の BSE 自然発症牛 (BSE 検査陽性) において、SRM 以外の末梢神経組織に PrP^{Sc} が WB 法を用いた解析により検出された (Iwamaru ら 2004; Iwata ら 2006)。また、国外においても、ウシの BSE 感受性に対して 10 倍の感度 (野生型マウスに比べ 1,000 倍の感度) を示すウシ型プリオン蛋白質過剰発現マウス (TgbovXV) を用いた感染試験により臨床末期の BSE 自然発症牛の末梢神経組織に感染性が認められている (Buschmann と Groschup 2006)。末梢神経での PrP^{Sc} の蓄積量は脊髄と比較して 1/1,000 ~ 1/4,000 倍であると考えられ (Iwata ら 2006)、TgbovXV を用いた感染試験から、その感染性は中枢神経系組織 (脳・脊髄) と比べ、1/10,000 ~ 1/100,000 倍という報告がされている。

これまで末梢神経にプリオンが蓄積する時期は明らかとされておらず、プリオン感染のリスク評価および BSE プリオンの動態を明らかにするためには、脳より先に末梢神経で PrP^{Sc} の蓄積が存在するか否かを検討する必要がある。

そこで我々は、英国との共同研究により、BSE 経口感染牛より経時的に採材された組織を用いて、末梢神経における PrP^{Sc} の蓄積時期について検討を行った。その結果、中枢神経系組織 (脳・脊髄) で PrP^{Sc} が検出された後に、末梢神経および副腎で PrP^{Sc} が検出された。このことから、末梢神経に認められる PrP^{Sc} は中枢神経系組織で増幅されたプリオンが、末梢神経に下降して蓄積したと考えられた。

SRM 以外の末梢神経および副腎で PrP^{Sc} の蓄積および感染性が確認された。このことは、現行の SRM 除去だけでは BSE の感染性を完全に排除することができないことを示唆する。しかし、末梢神経および副腎での PrP^{Sc} の蓄積は、脳での BSE 検査陽性個体または臨床症状を呈した個体からのみ検出される。したがって、現行の BSE 検査により、陽性個体を摘発し、ヒ

トへの食用から完全に排除することで、末梢神経および副腎に蓄積する PrP^{Sc} のリスクを回避できると考えられた。

PrP^{Sc} の検出感度の向上とトランスジェニックマウスを用いた感染試験により、ごく微量の PrP^{Sc} および非常に弱い感染性も検出することが可能となっている。BSE の伝播および拡散の防止のためには、最新の報告および知見をもとに、リスク評価を見直す必要がある。

12. おわりに

プリオン説が提唱されてから四半世紀を迎えようとしているが、プリオン病の発症機構をはじめ、プリオンの本態、プリオンの主要構成成分である PrP^{Sc} の立体構造および複製機構、そして、PrP^C の機能については未解明の部分が多数存在する。一方で、BSE および vCJD の発生に伴い、BSE 伝播および拡散防止対策としての BSE スクリーニングおよび SRM 除去、そして医療現場での二次感染 (医療行為および輸血等による) の防止に係る労力は大きな問題になっている。それらを解決するためにも、高感度かつ簡易に、そして短時間にプリオンが検出可能な技術の開発が求められている。現在、その一つの候補として、Protein-misfolding cyclic amplification (PMCA) 法が注目されている。PMCA 法は、試験管内で基質となる PrP^C と鋳型となるごく微量の PrP^{Sc} を混合し、インキュベーションと超音波処理を繰り返すことで、DNA を増幅する PCR 法のように PrP^{Sc} の増幅を可能とする (Saborio ら 2001)。スクレイピー感染ハムスターの血液を使った実験において、PMCA 法による血液でのプリオン病診断の可能性を示唆する報告がなされている (Castilla ら 2005)。PMCA 法を用いたプリオン病診断、プリオン汚染の評価法の確立が期待されているが、BSE および他のプリオン病の診断には、さらなる改良が必要であると考えられている。

近年、これまでのプリオンとは生物学的性状の異なる非定型スクレイピーおよび非定型 BSE の存在が報告されており、プリオン病を取り巻く状況は、さらに混沌としてきた。

引用文献

- Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB and Weissmann C. 1986. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, 46:

- 417–428.
- Bendheim PE, Brown HR, Rudelli RD, Scala LJ, Goller NL, Wen GY, Kascsak RJ, Cashman NR, Bolton DC. 1992. Nearly ubiquitous tissues distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology*, 42: 149–156.
- Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schonheit J, Tranulis MA, Bratberg B. 2003. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of new type, Nor 98. *The Veterinary record*, 153: 202–208.
- Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. 1982. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, 218: 1309–1310.
- Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D and Kretzschmar H. 1997. The cellular prion protein binds copper *in vivo*. *Nature*, 390: 684–687.
- Bueler H, Fisher M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp H-P, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M and Weissmann C. 1992. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal Cell-surface PrP Protein. *Nature*, 356: 577–582.
- Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCordle L, Chree A, Hope J, Birket C, Cousens S, Fraser H and Bostock CJ. 1997. Transmission to mice indicate that ‘new variant’ CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 389: 498–501.
- Buschmann A, Luhken G, Schultz J, Erhardt G, Groschup MH. 2004. Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrP^{ARR/ARR}). *Journal of General virology*, 85: 2727–2733.
- Buschmann A, Groschup MH. 2005. Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle. *The Journal of infectious diseases*, 192: 934–942.
- Carlson GA, Kingsbury DT, Goodman PA, Coleman S, Marshall ST, DeArmond S, Westaway D and Prusiner SB. 1986. Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes. *Cell*, 46: 503–511.
- Cashman NR, Loertscher R, Nalbantoglu J, Shaw I, Kascsak RJ, Bolton DC and Bendheim PE. 1990. Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell*, 61: 185–192.
- Castilla J, Saa P, Soto C. 2005. Detection of prions in blood. *Nature medicine*, 9: 982–985.
- Chandler RL. 1961. Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lnacet*, 1: 1378–1379.
- Collinge J, Whittington MA, Sidle KCL, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR and Jefferys JGR. 1994. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*, 370: 295–297.
- Collinge J, Sidle KCL, Meads J, Ironside J and Hill AF. 1996. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of ‘new variant’ CJD. *Nature*, 383: 685–690.
- Cuille J and Chelle PL. 1936. Pathologie animale-La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable. *Comptes rendus de l’Academie des sciences Paris*, 203: 1552–1554.
- De Bosschere H, Roels S, Benestad SL, Vanopdenbosch E. 2004. Scrapie case similar to Nor98 diagnosed in Belgium via active surveillance. *The Veterinary record*, 155: 707–708.
- Dickinson AG, Meikle VMH and Fraser H. 1968. Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *Journal of comparative pathology*, 78: 293–299.
- Fraser H, Foster JD. 1993. Transmission to mice, sheep and goat and bioassay of bovine tissues. In: *Transmissible spongiform encephalopathies*. (Bradley R, Marchant B eds.) 145–60. European Commission Agriculture. Brussels.
- Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr and Alpers M. 1967. Transmission and passage of experimental “kuru” to chimpanzees. *Science*, 155: 212–214.
- Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM and Matthews WB. 1968. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science*, 161: 388–389.
- Goldmann W, Hunter N, Smith G, Foster J and Hope J. 1994. PrP genotype and agent effects in scrapie change in allelic interaction with different isolates of agnet in sheep, a natural host of scrapie. *The Journal of general virology*, 75: 989–995.

- Hadlow WJ. 1959. Scrapie and kuru. *Lancet*, II: 289–290.
- Hermes JW, Ting T, Dunker S, Kretzschmar HA. 2001. Prion protein affects Ca^{2+} -activated K^+ currents in cerebellar Purkinje cells. *Neurobiology of disease*, 8: 324–330.
- Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KCL, Gowland I, collinge J, Doey LJ and Lantons P. 1997. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, 389: 448–450.
- Hilton DA, Ghani AC, Conyers L, Edwards P, McCardle L, Ritchie D, Penney M, Hegazy D, Ironside JW. 2004. Prevalence of lymphoreticular prion protein accumulation in UK tissue samples. *The Journal of pathology*, 203: 733–739.
- Horiuchi M, Ishiguro N, Nagasawa H, Toyada Y and Shinagawa M. 1998. Genomic structure of bovine PrP gene and complete nucleotide sequence of bovine PrP cDNA. *Animal genetics*, 29: 37–40.
- Horiuchi M, Yamazaki N, Ikeda T, Ishiguro N and Shinagawa M. 1995. A cellular form of prion protein (PrP^C) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *The Journal of general virology*, 76: 2583–2587.
- Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM, Lakey JH. 1995. Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 207: 621–629.
- Houston F, Goldmann W, Chong A, Jeffrey M, Gonzalez A, Foster J, Parnham D, Hunter N. 2003. BSE in sheep bred for resistance to infection. *Nature*, 423: 498
- Ikeda T, Horiuchi M, Ishiguro N, Muramatsu Y, Grathwohl K-W and Shinagawa M. 1995. Amino acid polymorphisms of PrP with reference to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep. *Journal of general virology*, 76: 2577–2581.
- Iwamaru Y, Ookubo Y, Ikeda T, Hayashi H, Imamura M, Yokoyama T, Shinagawa M. 2005. In *Prions-Food and Drug Safety* (Kitamoto T eds.) pp.179. Springer.
- Iwata N, Sato Y, Higuchi Y, Nohtomi K, Nagata N, Hasegawa H, Tobiume M, Nakamura Y, Hagiwara K, Furuoka H, Horiuchi M, Yamakawa Y, Sata T. 2006. Distribution of PrP(Sc) in cattle with bovine spongiform encephalopathy slaughtered at abattoirs in Japan. *Japanese journal of infectious diseases*, 59: 100–107.
- Klamt F, Dal-Pizzol F, Conte da Frota ML JR, Walz R, Andrades ME, da Silva EG, Brentani RR, Izquierdo I and Fonseca Moreira JC. 2001. Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free radical biology & medicine*, 30: 1137–1144.
- Le Dur A, Beringue V, Andreoletti O, Reine F, Lai TL, Baron T, Bratberg B, Vilotte JL, Sarradin P, Benestad SL, Laude H. 2005. A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 16031–16036.
- Lee IY, Westaway D, Smit AFA, Wang K, Seto J, Chen L, Acharya C, Ankener M, Baskin D, Cooper C, Yao H, Prusiner SB and Hood LE. 1998. Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome research*, 8: 1022–1037.
- Llewellyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will RG. 2004. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet*, 363: 417–421.
- Luhken G, Buschmann A, Groschup MH, Erhardt G. 2004. Prion protein allele A₁₃₆ H₁₅₄ Q₁₇₁ is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep. *Archives of virology*, 149: 1571–1580.
- Moore RC, Hope J, McBride PA, McConnell I, Selfridge J, Melton DW and Manson JC. 1998. Mice with gene targeted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are congruent. *Nature genetics*, 18: 118–125.
- Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM and Lellermann O. 2000. Signal transduction through prion protein. *Science*, 289: 1925–1928.
- Oesch B, Westaway D, Walchii M, McKinley MP, Kent SBH, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB and Weissmann C. 1985. Acellular gene encodes scrapie PrP 27–30 protein. *Cell*, 40: 735–746.
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE and Prusiner SB. 1993. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie

- prion protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90: 10962–10966.
- Prusiner SB, Groth DF, Cochran SP, Masiarz FR, McKinley MP and Martinez HM. 1980. Molecular properties, Partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. Biochemistry, 19: 4883–4891.
- Prusiner SB. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science, 216: 136–144.
- Prusiner SB. 1991. Molecular Biology of prion disease. Science, 252: 1515–1522.
- Jarrett JT and Lansbury PT Jr. 1993. Seeding “one-dimensional crystallization” of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer’s disease and scrapie? Cell, 73: 1055–1058.
- Puckett C, Concannon P, Casey C and Hood L. 1991. Genomic structure of the human prion protein gene. American journal of human genetics, 49: 320–329.
- Saborio GP, Permann B, Soto C. 2001. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. Nature, 411: 810–813.
- Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T, Nakatani A, Kataoka Y, Houtani T, Shirabe S, Okada H, Hasegawa S, Miyamoto T and Noda T. 1996. Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. Nature, 380: 528–531.
- Schlapfer J, Gallagher DS Jr, Burzlaff JD, Womack JE, Stelly DM, Taylor JF and Davis SK. 1998. Comparative mapping of bovine chromosome 13 by fluorescence *in situ* hybridization. Animal genetics, 29: 265–272.
- Scott MR, Safar J, Telling G, Nguyen O, Groth D, Torchia M, Koehler R, Tremblay P, Walther D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB. 1997. Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prion to transgenic mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94: 14279–14284.
- Scott MR, Will R, Ironside J, Nguyen H-O B, Tremblay P, DeArmond SJ and Prusiner SB. 1999. Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prion to humans. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96: 15137–15142.
- Sparkes RS, Simon M, Cohn VH, Fournier REK, Lem J, Klisak I, Heinzmann C, Blatt C, Lucero M, Mohandas T, DeArmond SJ, Westaway D, Prusiner SB, Weiner LP. 1986. Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 83: 7358–7362.
- Stahl N, Baldwin MA, Burlingame AL and Prusiner SB. 1990. Identification of glycoinositol phospholipid linked and truncated forms of the scrapie prion protein. Biochemistry, 29: 8879–8884.
- Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rulicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA and Manson JC. 1996. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. Nature, 380: 639–642.
- Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M, Bradley R. 1987. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. The Veterinary record, 141: 484–489.
- Wells GAH, Dawson M, Hawkins SAC, Green RB, Dexter I, Francis ME, Simmons MM, Austin AR, Horgan MW. 1994. Infectivity in the ileum of cattle challenged orally with bovine spongiform encephalopathy. The Veterinary record, 135: 40–41.
- Wells GAH, Dawson M, Hawkins SAC, Austin AR, Green RB, Dexter I, Horgan MW and Simmons MM. 1996. Bovine Spongiform Encephalopathy: The BSE Dilemma (Clarence J, Gibbs, Jr eds.) pp.28. Springer. New York.
- Wells GAH, Hawkins SAC, Green RB, Austin AR, Dexter I, Spencer YI, Chaplin MJ, Stack MJ and Dawson M. 1998. Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. The Veterinary record, 142: 103–106.
- Wells GAH, Hawkins SAC, Green RB, Spencer YI, Dexter I and Dawson M. 1999. Limited detection of sternal bone marrow infectivity in the clinical phase of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE). The Veterinary record, 144: 292–294.
- Westaway D, Goodman PA, Mirenda CA, McKinley MP,

- Carlson GA and Prusiner SB. 1987. Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell*, 51: 651–662.
- Westaway D, Copper C, Turner S, Da Costa M, Carlson GA and Prusiner SB. 1994. Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 6418–6422.
- Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG. 1996. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, 347: 921–925.
- Zlotnik I and Rennie JC. 1962. The pathology of the brain of mice inoculated with tissues from scrapie sheep. *Journal of comparative pathology*, 72: 360–365.
-